

## [原 著]

## 主要な血清型の大腸菌を検出する酵素基質培地の開発

北川真喜・市石 卓・葛原繁明・江成 博  
 極東製薬工業株式会社 研究開発本部 製品開発部

(平成23年9月22日受付, 平成24年6月28日受理)

腸管出血性大腸菌 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) の主要な血清型である O157, O26, O111 の鑑別・分離を目的としたバイタルメディア CIX 寒天培地を開発した。2種類の酵素基質を利用することで O157 は青～青緑色, O26, O111 は群青～濃紫色に呈色する。また pH 指示薬と CLIG 寒天培地で大腸菌の鑑別に有用性が確認されているセロビオースを添加することで, 類似の呈色を示す菌種を可能な限り低減させた。EHEC; 27 株およびベロ毒素 (VT) 非産生 O157; 2 株を用いた検討では, Cefixime-tellurite (CT) 耐性の 13 株は所期の色を呈したが, CT 感受性の 16 株は非発育あるいは極めて弱い発育であった。*Escherichia coli*; 2 株および *Enterobacteriaceae*; 18 株では, *Escherichia hermannii* 1 株を除き非発育あるいは極めて弱い発育であった。糞便材料 40 検体を用いて検討した結果, 目的菌以外で発育した常在菌は *Klebsiella* spp. が最も多く, 次いで *Enterobacter* spp. であった。しかしながら, EHEC との判別は可能であった。本培地を使用することで, 類似の呈色を示す大腸菌以外の菌種が低減可能となり検査の効率化が期待される。

**Key words:** 腸管出血性大腸菌 (EHEC), 酵素基質, CIX 寒天培地, Cefixime-tellurite

## 序 文

腸管出血性大腸菌 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 感染症は, 感染症法に基づく感染症発生動向調査の三類感染症として, 大腸菌の分離・同定と Verotoxin (VT) の確認により診断した医師の全数届出が義務づけられている。また平成22年に本学会より発行された「腸管感染症検査ガイドライン」には, EHEC の検出・同定は志賀毒素の検出が最も重要であり, 血清型や菌種同定は補助的な検査手段であると記載されている。

一方で臨床微生物検査以外の分野においては, 平成20年6月に大量調理施設衛生管理マニュアル (厚生労働省: 食安発第0618005号) が改正され, 調理従事者等の検便検査は「腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検査を

含めること」となった。しかしながら, 具体的な検査法が明示されておらず, 多検体に対して CT-SMAC, CT-RMAC, CT-SBMAC などを用いた煩雑な作業に各検査機関が独自に対応している状況である。

「調理従事者等の検便検査」は, 集団防衛の見地から設定されたと考えられるのに対して「臨床微生物検査における EHEC 検索」は個別患者の起因菌の追及であることから, それぞれの検体当たりの人的ならびに物的コストの投入の仕方に違いがある。

そこで近年, 分離頻度の高い O157, O26, O111 三つの血清群を酵素基質培地で検出する方法も用いられているが, 酵素基質のみでは類似の呈色を示す他菌種を *Escherichia coli* と誤認する頻度が高い。そのため, これを可能な限り低減させるためにバイタルメディア CIX 寒天培地を開発したので報告する。

## 材料と方法

## 1. 供試菌株

供試した菌株の詳細を Table 1 に示す。1990～2007 年に分離された OUT を含む 12 種の血清型からなる EHEC O157; 8 株, O26; 2 株, O111; 2 株, その他の血清型 EHEC; 15 株, および VT 非産生 O157; 2 株,

著者連絡先: (〒318-0004) 茨城県高萩市大字上手綱字朝山 3333-26  
 極東製薬工業株式会社 研究開発本部  
 製品開発部  
 北川真喜  
 TEL: 0293-23-0909  
 FAX: 0293-24-1366  
 E-mail: kitagawa@kyokutoseiyaku.co.jp

Table 1. List of strains tested

Strains	Serogroup	Origin	VT	N
EHEC	O157	ATCC43894	VT1, 2	1
		ATCC35150	VT1, 2	1
		Isolates	VT1, 2	5
		Isolates	VT2	1
	O26	Isolates	VT1	1
		Isolates	VT1, 2	1
	O111	Isolates	VT1, 2	2
	O121	Isolates	VT2	1
	O145	Isolates	VT2	1
	O1	Isolates	VT1	1
	O91	Isolates	VT1	2
	O103	Isolates	VT1	2
	O113	Isolates	VT1, 2	1
	O128	Isolates	VT1, 2	1
	O165	Isolates	VT2	4
OUT	Isolates	VT1	2	
<i>Escherichia coli</i>	O157	Isolates	—	2
	O6	ATCC25922	—	1
		IFO13500	—	1
<i>Escherichia hermannii</i>		Isolates	—	1
<i>Enterobacter cloacae</i>		ATCC23355	—	1
<i>Proteus mirabilis</i>		ATCC43071	—	1
<i>Proteus vulgaris</i>		ATCC13315	—	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC23357	—	1
		ATCC13883	—	1
<i>Citrobacter freundii</i>		ATCC8090	—	1
<i>Salmonella</i> Typhimurium		ATCC14028	—	1
<i>Salmonella</i> Typhi		Isolates	—	1
<i>Salmonella</i> Paratyphi A		Isolates	—	1
<i>Salmonella</i> spp.	O7	Isolates	—	1
<i>Shigella sonnei</i>		ATCC9290	—	1
<i>Shigella boydii</i>		ATCC9207	—	1
<i>Shigella dysenteriae</i>		ATCC13313	—	1
<i>Shigella flexneri</i>		ATCC12022	—	1
<i>Serratia marcescens</i>		ATCC8100	—	1
<i>Morganella morganii</i>		ATCC25830	—	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC27853	—	1
Total				49

*Escherichia coli*; 2株, *Enterobacteriaceae*; 18株を用いた。

## 2. 供試検体

某検査機関において2010年1月～8月に収集されたO157陽性検体; 12件, O26陽性検体; 6件, EHEC陰性検体; 22件の計40件の糞便検体を用いた。

## 3. 供試培地

バイタルメディア CIX 寒天培地 (CIX; 極東製薬), 酵素基質培地-A (培地A), 酵素基質培地-B (培地

B), 酵素基質培地-C (培地C), 酵素基質培地-D (培地D) を用いた。CIXの組成を以下に示す。カゼインペプトン混合物; 9.7 g, 胆汁酸塩; 1.5 g, 塩化ナトリウム; 5.0 g, 寒天; 15.0 g, セロビオース; 10.0 g, 酵素基質2種, 選択剤 (Cefixime-tellurite; CT), pH指示薬。

## 4. 保存菌株を用いた発育および呈色の確認

バイタルメディア羊血液寒天培地にて保存菌株を

35℃ 18時間培養後、滅菌生理食塩水にてMcFarland #1.0に調整し検討菌液とした。検討菌液1 白金耳量をCIX, 培地A, 培地B, 培地C, 培地Dに画線塗抹, 35℃ 18時間培養後に発育および呈色を確認した。

### 5. 病原大腸菌免疫血清によるO群型別試験およびデュオバス・ペロトキシンへの適応確認

検討菌液をCIXに画線塗抹, 35℃ 18時間培養した。発育した集落より直接, 病原大腸菌免疫血清「生研」(免疫血清; デンカ生研)によるO群型別試験とデュオバス・ペロトキシン(DV; MERCK)への適応を確認した。

### 6. CT添加量の検討

CIXに非発育であったEHEC; 14株およびVT非産生O157; 2株, *E. coli*; 2株のCT感受性を確認するため, Cefixime (CFIX)を通常添加量の0.05 mg/Lから1/2量; 0.025 mg/L, 1/4量; 0.0125 mg/Lに減量した培地およびPotassium tellurite (PT)を通常添加量の2.5 mg/Lから1/2量; 1.25 mg/L, 1/4量; 0.625 mg/Lに減量した培地ならびにCT未添加の培地を作製した(検討培地)。McFarland #1.0に調整した菌液1 白金耳量を検討培地に画線塗抹, 35℃ 18時間培養後に発育の有無を確認した。

### 7. 糞便検体を用いた培地性能比較

糞便検体をCIX, 培地A, 培地Bに画線塗抹し, 35℃ 18時間培養後, 発育および呈色を確認した。また, 添付文書記載の方法に従い病原大腸菌免疫血清およびDVを用いて, 発育した集落のO血清型およびVT産生の有無を確認した。

## 結 果

### 1. 保存菌株を用いた発育および呈色の確認

試験結果をTable 2に示す。CIXではO157; 青～青緑色, O26およびO111; 群青～濃紫色に呈色した(Fig. 1)。培地AではO157; 赤色, O26; 緑色, O111; 赤～赤紫, 培地BではO157; 紫色, O26; 白濁した青紫色, O111; 白濁した紫色, 培地CではO157, O26, O111; 藤色, 培地DではO157; 無色透明, O26; 緑色, O111; 赤色を呈した。供試したEHEC; 27株のうち, CIXに発育した株は13株, 残り14株は非発育あるいは極めて弱い発育であり, VT非産生O157; 2株も非発育であった。これらCIXで非発育であった株は, 培地A, B, C, Dにおいても非発育であった。*E. coli*; 2株およびEnterobacteriaceae; 18株のうち, *Escherichia hermannii* 1株を除く19株は非発育あるいは極めて弱い発育であった。発育した*E. hermannii*は青色の集落を

形成し, EHECとの判別は容易であった。

### 2. 病原大腸菌免疫血清によるO群型別試験およびデュオバス・ペロトキシンへの適応確認

CIXに発育したEHEC; 13株の集落より直接, 免疫血清によるO群型別試験とDVによるペロ毒素産生の確認を行った。その結果, すべての菌株において添付文書に記載の方法で確認した結果と一致した。

### 3. CT添加量の検討

CIXに非発育であったEHEC; 14株およびVT非産生O157; 2株, *E. coli*; 2株の検討培地における成績をTable 3に示す。18株のうち17株はPTを1/4量まで減量した培地においても非発育あるいは非常に微弱な発育であった。また, CFIXに感受性であった株は2株であった。

### 4. 糞便検体を用いた培地性能比較

EHECの発育結果をTable 4に示す。各培地, O157, O26ともに所期の色に呈色したが, 培地Aでのみ非着色の集落を形成した菌株がO157, O26それぞれ1株あった(Fig. 2)。これら2株の酵素活性をアピザイム(シスメックス・ピオメリュウ)で確認した結果,  $\alpha$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucuronidaseの活性が見られなかった。これらの酵素欠損が非着色集落となった原因であると推察する。また, いずれの培地でもCT耐性VT陰性の*E. coli*ならびにEnterobacter spp.はEHECと類似の色調を示す傾向にあった。発育した常在菌で最も多かったのはKlebsiella spp.であり, 次いでEnterobacter spp.であった(Table 5)。

## 考 察

「調理従事者等の検便検査」における「調理師」は無症候であり(症候があれば患者である), 検体中のEnterobacteriaceaeの菌量は高い。一方, 1982年以降のEHEC感染に関する知見ではO157, O26, O111が上位を占める事実がある。病原大腸菌免疫血清の混合1(広義あるいは古典的EPEC)に含まれていたが, 現在ではO群による定義ではなく, LT, ST, VTを産生しない*eaeA*を保有する*E. coli*を指すとされる。また, EHEC O157, O26, O111はVT産生とともに*eaeA*保有株が多い。Fukushima<sup>1), 2)</sup>はCT耐性と*eaeA*保有に相関が見られるとしている。このことがEHEC O157, O26, O111の検出にCTが賞用される主因と考えられる。

しかしながらO103, O165などのマイナーな血清群のEHECには*eaeA*を保有するもCT-SMACでは抑制されるものが存在する。したがって「臨床微生物検査におけるEHEC検索」ではFukushimaのdataの患者由

Table 2. Growth and colony color of bacterial strains on three EHEC selective agars

Strains	Serogroup	Origin	VT	N	Colony color on				
					CIX	A	B	C	D
EHEC	O157	ATCC43894	VT1, 2	1	青緑	赤	紫	薄藤色	無色透明
		ATCC35150	VT1, 2	1	青緑	赤	紫	薄藤色	無色透明
		Isolates	VT1, 2	4	青緑	赤	紫	薄藤色	無色透明
		Isolates	VT2	1	青緑	赤	紫	薄藤色	無色透明
		Isolates	VT1, 2	1	濃紫	薄茶	群青	薄藤色	暗緑
	O26	Isolates	VT1	1	濃紫	緑	白濁青	藤色	青緑
		Isolates	VT1, 2	1	濃紫	緑 (濃淡)	白濁紫	藤色	青緑
	O111	Isolates	VT1, 2	1	濃紫	赤紫	白濁紫	薄藤色	赤
		Isolates	VT1, 2	1	濃紫	赤	白濁紫	薄藤色	密集部：無色 赤 密集部：無色
	O121	Isolates	VT2	1	ピンク	赤紫	白濁緑	透明～薄藤色	青緑
	O145	Isolates	VT2	1	**w濃紫	**w透明～赤紫	**w白濁青	**w透明～薄藤色	**w紫
	O1	Isolates	VT1	1					
	O91	Isolates	VT1	2					
	O103	Isolates	VT1	2					
	O113	Isolates	VT1, 2	1			*No growth		
	O128	Isolates	VT1, 2	1					
	O165	Isolates	VT2	4					
	OUT	Isolates	VT1	2					
	<i>Escherichia coli</i>	O157	Isolates	—	2				
		O6	ATCC25922	—	1			*No growth	
		IFO13500	—	1					
<i>Escherichia hermannii</i>	Isolates	—	1	青	ピンク	藤色	薄茶	ピンク	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC23355	—	1						
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC43071	—	1						
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC13315	—	1						
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC23357	—	1						
	ATCC13883	—	1						
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	—	1						
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC8100	—	1						
<i>Morganella morganii</i>	ATCC25830	—	1			*No growth			
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC14028	—	1						
<i>Salmonella</i> Typhi	Isolates	—	1						
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	Isolates	—	1						
<i>Salmonella</i> spp.	Isolates	—	1						
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC9290	—	1						
<i>Shigella boydii</i>	ATCC9207	—	1						
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC13313	—	1	**w無色透明	**w無色透明	**w薄ピンク	**w無色透明	**w無色透明	
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC12022	—	1	**w無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	—	1	*NG	*NG	**w無色透明	**w無色透明	**w無色透明	
Total				49					

\*NG, no growth

\*\*w, growth week

来株数とCT耐性株の割合を勘案すれば EHEC O157, O26, O111 についてはCT添加培地が有効であるが, 他の血清群についてはCT添加培地のみ使用は禁忌である。さらに分離株を供試した場合に CT 耐性を示

したとしても当該株による感染時に病日の経過とともに起こる菌量低下によりCT添加培地では分離不能となることも考えられる。そのためCT添加培地に EHECが発育しなかったことを理由に EHEC感染を否

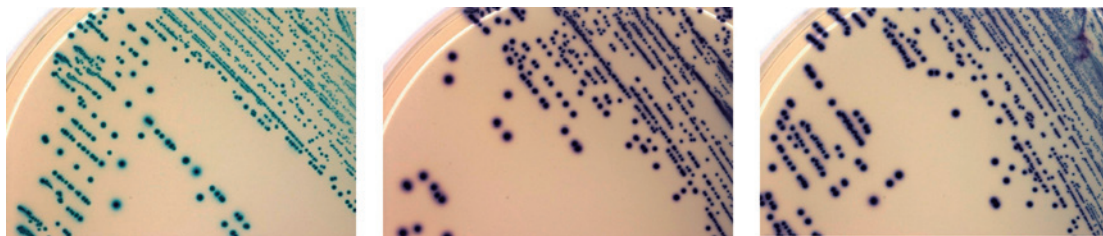


Fig. 1. EHEC colony color observation on CIX agar  
Incubated at 35°C for 18 hours  
EHEC O157 ATCC35150, EHEC O26 isolates, and EHEC O111 isolates, respectively



Fig. 2. Growth appearances of three EHEC selective agars inoculated with sample No. 3  
Incubated at 35°C for 18 hours  
Vital media CIX agar, Chromogenic agar A, and Chromogenic agar B, respectively

Table 3. Antimicrobial susceptibility of cefixime and potassium tellurite for bacterial strains on CIX agar

Strains	Serogroup	Origin	VT	CIX	CT	CFIX (mg/L)			PT (mg/L)			
					free	0.0125	0.025	0.05	0.625	1.25	2.5	
EHEC	O145	Isolates	VT2	12CFU	*G	G	G	G	23CFU	G	G	G
	O1	Isolates	VT1	**NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O91	Isolates	VT1	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O91	Isolates	VT1	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O103	Isolates	VT1	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O103	Isolates	VT1	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O113	Isolates	VT1,2	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O128	Isolates	VT1,2	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O165	Isolates	VT2	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O165	Isolates	VT2	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O165	Isolates	VT2	NG	G	G	G	G	1CFU	4CFU	NG	
	O165	Isolates	VT2	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	OUT	Isolates	VT1	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	OUT	Isolates	VT1	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
<i>Escherichia coli</i>	O157	Isolates	—	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
	O157	Isolates	—	NG	G	G	G	G	***w	NG	NG	
	O6	ATCC25922	—	NG	G	G	G	G	NG	NG	NG	
		IFO13500	—	NG	G	G	G	G	13CFU	w	NG	

\*G, growth

\*\*NG, no growth

\*\*\*w, growth week

Table 4. Biochemical characteristics of EHEC isolated from faecal samples

Strains	Serogroup	VT	No.	CIX		A		B	
				Growth	Color	Growth	Color	Growth	Color
EHEC	O157	VT2	1	1+	青緑	1+	赤	1+	紫
		VT2	2	1+	青緑	1+	赤	w**	紫
		VT1, 2	3	4+	青緑	3+	非着色	2+	紫
		VT1, 2	4	3+	青緑	3+	赤	2+	紫
		VT1, 2	5	2+	青緑	2+	赤	1+	紫
		VT1, 2	6	1CFU	青緑	1CFU	赤	NG*	—
		VT1, 2	7	1+	青緑	1+	赤	2+	紫
		VT2	8	2+	青緑	1+	赤	1+	紫
		VT2	9	4+	青緑	2+	赤	2+	紫
		VT1, 2	10	1+	青緑	1CFU	赤	1+	紫
		VT1, 2	12	1+	青緑	1CFU	赤	1+	紫
		VT1, 2	13	1+	青緑	1+	赤	1CFU	紫
			O26	VT1	104	2+	濃紫	2+	暗緑
VT1	105			3+	濃紫	2+	暗緑	3+	青紫
VT1	106			2+	青緑	2+	非着色	2+	薄紫白濁
VT1	110			3+	濃紫	2+	暗緑	3+	青紫
VT1	112			3+	濃紫	2+	暗緑	2+	青紫

\*NG, no growth

\*\*w, growth week

Table 5. Colony appearances of *Enterobacteriaceae* other than EHEC from faecal samples

Strains	VT	CIX		A		B	
		N	Color	N	Color	N	Color
<i>Escherichia coli</i>	—	5	青緑, 濃紫	3	赤, 緑	3	白, 青, 青紫
<i>Klebsiella</i> spp.	—	11	ピンク～紫	7	赤～赤紫	11	白～薄紫
<i>Enterobacter</i> spp.	—	10	ピンク～紫, 濃紫	4	赤～赤紫	9	白～薄紫, 紫
<i>Escherichia hermannii</i>	—	4	非着色～薄茶	3	非着色～薄茶	3	非着色～薄茶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	1	薄茶	1	薄茶	1	薄茶
Other <i>Enterobacteriaceae</i>	—	3	紫	3	薄茶～赤紫	2	白～薄茶

定することはできない。すなわち「臨床微生物検査における EHEC 検索」においては CT 不含培地の併用は必須である。とりわけ HUS に進展する EHEC の多くは VT2 産生能を保有する傾向が高いと考えられる。

これまで CT 感受性 EHEC の分離には MacConkey, DHL などを併用すれば良いとする報告が多いが, CT 耐性の有無にかかわらず, *E. coli* として異型の性状を示す株が存在する。すなわち MacConkey, DHL などで lactose からの酸産生性を示さない株も存在することから, これら異型の EHEC の可能性を考慮して無色集落も釣菌する必要がある。

今回供試した保存菌株や糞便検体においても非定型の着色を示す株が認められている。このことから EHEC を選択分離するために酵素基質培地で使用され

ている galactopyranoside, glucuronic acid<sup>3)</sup>ではすべての菌株を呈色させることは不可能であることを念頭に置かなければならない。

これらの問題の対策として連名の江成は第22回日本臨床微生物学会総会<sup>4)</sup>において X-β-D-galactoside, X-β-D-glucuronide, X-α-D-galactoside により, これら異型性状株の集落を青色化させるとともに α-D-galactosidase を保有する *Salmonella* spp. の多くを propylene glycol からの酸産生に伴う赤色化 (実際の集落は紫色化) により除外, *E. coli* 以外で X-β-D-galactoside により青色化する菌種については cellobiose, inositol からの酸産生に伴う赤色化 (実際の集落は紫色化) により, 多くは除外できるとした。その他の *Enterobacteriaceae* では β-D-galactosidase, β-D-glucuronidase, α-D-galacto-

sidaseの3種の酵素活性が陰性の菌種は集落の青色化を示さず, phenylalanine, ferric ammonium citrate添加により, phenylalanine deaminase陽性菌種は集落と周囲の褐色化により除外可能であることを示した。なお, 同培地では *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, および一部の *Shigella* spp. が *E. coli* と同様の呈色を示すことを報告した (未投稿)。

また, われわれが第58回日本医学検査学会で報告した塩酸処理法<sup>5),6)</sup>による大腸菌の選択分離や患者検体をEC培地で増菌後に培養液を使用し, デュオパス・ベロトキシンにてVT産生の有無を確認する方法<sup>7),8)</sup>などの検査法を必要に応じて追加する必要がある。EC培地は臨床検査では馴染みの薄い培地ではあるが安価であり, 腸管感染症検査ガイドラインの「VT産生性の把握」の趣旨からすればマルチセンター方式での評価を経たうえで早期に導入されるべきと考える。

#### 文 献

- 1) Fukushima, H., K. Hoshina, M. Gomyoda. 2000. Selective isolation of *eae*-positive strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 38: 1684-1687.
- 2) Fukushima, H., R. Seki, 2004. High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faces collected at slaughter in Japan. FEMS Microbiol. Lett. 238: 189-197
- 3) 坂崎利一. 1997. 発色 (光) 酵素基質の臨床微生物学への応用. 日臨微誌 3: 167-177.
- 4) 江成 博, 市石 卓, 北川真喜, 他. 2010. 腸管出血性大腸菌検出用培地の試み. 日臨微誌 20: 123.
- 5) Fukushima, H., M. Gomyoda, 1999. Hydrochloric acid treatment for rapid recovery of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from feces, food and environmental samples. Zentralbl. Bakteriologie 289: 285-289.
- 6) 北川真喜, 葛原繁明. 2009. 塩酸処理法を用いた大腸菌検出の検討. 医学検査 58: 502.
- 7) Park, C. H., A. Bubern. 2005. Efficient Detection of Shiga-toxin Producing *E. coli* from Human Stool Samples by Duopath Verotoxins in Enriched EC broth. ASM Conference in 2005 in Atlanta, USA.
- 8) 北川真喜, 葛原繁明, 江成 博. 2009. 腸管出血性大腸菌の24時間検出は可能か. 日臨微誌 19: 140

## Development of Chromogenic Selective Medium: Vital Media CIX Agar for Differentiation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Maki Kitagawa, Suguru Ichiishi, Shigeaki Kasahara, Hiroshi Enari  
Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.,  
Kamitezuna, Takahagi, Ibaraki 318-0004, Japan

We describe here the development of Vital media CIX agar (CIX agar), a new chromogenic agar medium for the specific isolation and identification of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) such as major serotype O157, O26 and O111. Colonies of *E. coli* O157 growing on CIX agar produce a mauve color and colonies of *E. coli* O26 and O111 growing on CIX agar produce ultramarine color due to two chromogenic substrates in the medium, thus allowing presumptive identification from the primary isolation plate and differentiation from other organisms. The addition of pH indicator and cellobiose which indicated for differentiation of *E. coli* in the CLIG agar has decreased growth of other bacteria such as homologous colony presented. We evaluated the use of this medium with 27 EHEC isolates and 2 verotoxin non-producing O157 isolates. The 13 Cefixime-tellurite (CT) resistant EHEC isolates presented determinate colors, however the 16 CT sensitive EHEC isolates growth inhibition or weak growth caused by CT. *E. coli* and 13 *Enterobacteriaceae* were inhibited by CT, except for *Escherichia hermannii*. Investigation of 40 stool specimens showed that pigmented normal flora was *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. However, all strains of EHEC grew abundantly and were easily distinguished on CIX agar as typical colonies.

We concluded that CIX agar is a sensitive and specific medium for the isolation and identification of EHEC such as major serotype O157, O26 and O111.